

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2003-304778**

(43)Date of publication of application : **28.10.2003**

(51)Int.Cl.

A01K 67/027

A61K 38/22

A61K 45/00

A61K 48/00

A61P 1/18

A61P 3/10

C12N 15/09

G01N 33/15

G01N 33/50

// C07K 14/47

(21)Application number : **2002-111852** (71)Applicant : **TAISHO
PHARMACEUT CO
LTD
BABA AKEMICHI**

(22)Date of filing : **15.04.2002** (72)Inventor : **BABA AKEMICHI
HASHIMOTO
HITOSHI
SHINTANI NORITO
TOMIMOTO SHUHEI
MATSUDA TOSHIO**

(54) TRANSGENIC NON-HUMAN MAMMAL**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a model animal useful for elucidating action of PACAP to a pancreatic island in vivo.

SOLUTION: The transgenic non-human mammal or its part comprises expressing a pituitary adenylate cyclase activated polypeptide by introduction of a pituitary adenylate cyclase activated polypeptide gene and developing diabetes mellitus by a gene manipulation.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 06.04.2005

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of
rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The transgenic nonhuman mammal characterized by discovering this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation, or its part.

[Claim 2] The transgenic nonhuman mammal according to claim 1 which carries out the superfluous manifestation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide by the pancreas, or its part.

[Claim 3] The transgenic nonhuman mammal according to claim 1 or 2 produced by crossing the transgenic nonhuman mammal which discovers this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation, or its part.

[Claim 4] (1) Rather than the transgenic nonhuman mammal characterized by showing a plasma insulin value lower than the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation, and showing the symptoms of diabetes mellitus by; (2) genetic manipulation Rather than the transgenic nonhuman mammal characterized by the organ weight of the pancreas showing the symptoms of diabetes mellitus by; and/or (3) genetic manipulations greatly : by which the hypermorphosis of pancreas Langerhans' islet (pancreatic islet) is controlled -- a transgenic nonhuman mammal given in any of claims 1-3 which are characterized by things they are, or its part.

[Claim 5] A transgenic nonhuman mammal or its part of publication for any of claims 1-4 whose nonhuman mammal is a mouse their being

[Claim 6] The screening approach of of the diabetic therapy agent and/or preventive which are characterized by using a nonhuman mammal given in any of claims 1-5 they are, or its part.

[Claim 7] Matter obtained by the screening approach according to claim 6.

[Claim 8] The diabetic therapy agent and/or preventive which contain the matter obtained by the screening approach according to claim 6 as an active principle.

[Claim 9] Drugs for the acceleration of playback of the pancreas tissue which contains the gene which carries out the code of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide or it as an active principle, or formation control of a pancreatic islet.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to a transgenic nonhuman mammal. This invention relates to the transgenic nonhuman mammal of the diabetes-mellitus onset model characterized by discovering this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene more at a detail. This invention relates also to utilization of the gene which carries out the code of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide or it again.

[0002]

[Description of the Prior Art] A hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PACAP) With the neuropeptide belonging to secretin / glucagon / vasoactive intestinal polypeptide (VIP) family It is known that the physiological function will bear variegated roles, such as composition / secretion accommodation of a hypophysis and adrenaline, and differentiation, a growth promotion operation of a nerve cell and a sexual cell, (Hashimoto et al.). Baba Myodo: The structure and the function of a neuro-peptide PACAP receptor Ayumi of a separate volume and medicine, new expansion of 2001 or 7 times film penetration mold receptor research 79-84 Hashimoto et al., Baba Myodo.

[0003] The thing of 10-14M for the glucose inductivity insulin secretion from a isolation pancreatic islet extremely promoted by low concentration is known by that a PACAP immunity positivity nerve projects on a pancreatic islet in the pancreas, that the manifestation of VPAC2 receptor which shows compatibility comparable to PACAP to both PAC1 with high compatibility receptor, and PACAP and VIP among PACAP receptor subtypes is seen by the pancreas beta cell, and the list. Moreover, PACAP(s) are various cells, and since it has cytoprotection or an acceleration operation of differentiation or growth, it is predicted that such an operation is seen also in a pancreas

beta cell.

[0004] However, since PACAP has various operations as mentioned above in the living body, in the experiment investigated about the saccharometabolism by PACAP administration, the interpretation of the result is complicated (Filipsson K, Pacini G, Scheurink AJ, Ahren B.:PACAP stimulates insulin secretion but inhibits insulin sensitivity in mice.Am J Physiol 1998 May 274(5 Pt 1):E834-42).

[0005] Moreover, since still alternative low-molecular agonist does not exist in a PACAP signal system, the operation to the pancreatic islet of PACAP in vivo has many points which are not clear.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention made it the technical problem which should be solved to provide solving the operation to the pancreatic islet of PACAP in vivo with a useful model animal. This invention made it to utilize PACAP as drugs further the technical problem which should be solved by solving the operation to the pancreatic islet of PACAP in vivo.

[0007]

[Means for Solving the Problem] an object [investigate / PACAP / as for this invention persons / what kind of operation is shown in the pancreas / by in vivo / in advance of this invention] -- carrying out -- the bottom of human insulin promotor control -- the pancreas -- the transgenic mouse (Tg/+) which carries out the superfluous manifestation of the PACAP specifically was produced, and it had found out that this mouse showed insulin secretion ability higher than the wild type (+/+) mouse of a brood.

[0008] It aims at this invention persons investigating by in vivo what kind of operation PACAP shows in the pancreas of a diabetes-mellitus model animal further based on this knowledge. agouti yellow which shows the symptoms of obesity and diabetes mellitus in a prepotence format Are obtained by crossing with a mouse (Ay/+) and a Tg/+ mouse. By analyzing the mouse (+/+, Tg/+, Ay/+, Tg/+:Ay/+) of four kinds of genotypes, it examined what kind of operation PACAP would exert on the saccharometabolism in diabetes-mellitus symptoms. Furthermore, this invention persons added examination from histological analysis also about what kind of effect PACAP has on the gestalt of a pancreatic islet in diabetes-mellitus symptoms.

[0009] this invention persons found out that pancreas weight was large and pancreatic islet weight was small compared with an Ay/+ mouse for the first time with the Tg/+:Ay/+ mouse this time as a result of the above-mentioned examination. This invention is completed based on these knowledge.

[0010] That is, according to this invention, the transgenic nonhuman mammal characterized by discovering this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and showing the symptoms of

diabetes mellitus by genetic manipulation or its part is offered.

[0011] The transgenic nonhuman mammal which carries out the superfluous manifestation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide by the pancreas according to the desirable mode of this invention, or its part; the transgenic nonhuman mammal produced by crossing the transgenic nonhuman mammal which discovers this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation, or its part;

(1) A plasma insulin value lower than the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation is shown. (2) rather than the transgenic nonhuman mammal characterized by showing larger pancreas organ weight than the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation, and showing the symptoms of diabetes mellitus by; and/or (3) genetic manipulations the transgenic nonhuman mammal characterized by controlling the hypermorphosis of pancreas Langerhans' islet (pancreatic islet), or its part -- the transgenic nonhuman mammal whose nonhuman mammal is a mouse at; list, or its part -- : is offered.

[0012] according to another side face of this invention -- the above -- the matter obtained by the screening approach of of the diabetic therapy agent and/or preventive which are characterized by using which nonhuman mammal or its part, and the screening approach concerned, and a list are provided with the diabetic therapy agent and/or the preventive which contain the matter obtained by the screening approach concerned as an active principle. According to still more nearly another side face of this invention, the drugs for the acceleration of playback of the pancreas tissue which contains the gene which carries out the code of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide or it as an active principle, or formation control of a pancreatic islet are offered.

[0013]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, the gestalt of operation of this invention is explained to a detail.

(1) The transgenic nonhuman mammal of description this invention of the transgenic nonhuman mammal of this invention is characterized by discovering this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation, and carries out the superfluous manifestation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide by the pancreas by transgenics preferably.

[0014] According to the desirable mode, the transgenic nonhuman mammal of

this invention is characterized more nearly especially than the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation by the abnormalities in structure of the pancreas including the hypermorphosis of a pancreatic islet being controlled. More specifically, "the abnormalities in structure of the pancreas including the hypermorphosis of a pancreatic islet being controlled" said on these descriptions means the condition which shows all the descriptions of the following any 1 or more [of - (3)] and (1) desirable following(1) - (3).

(1) A plasma insulin value lower than the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation is shown.;

(2) Rather than the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation Rather than the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by; with the large organ weight of the pancreas, and/or (3) genetic manipulations : by which the hypermorphosis of pancreas Langerhans' islet (pancreatic islet) is controlled (that is, the number of the pancreatic islets in the unit pancreas area observed when the speculum of the thin-sectioning intercept is produced and carried out from the pancreas extracted from the transgenic nonhuman mammal of this invention is decreasing) [0015] The "hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene" said on these descriptions is a gene which carries out the code of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide, and all the variant genes that have the same function as these genes in the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene of mammalian and a list are included.

[0016] As a peptide which promotes the adenylate SAIKU ball-race activity of a hypophysis, the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide (PACAP) was isolated for the first time from sheep hypothalamus (Biochem.Biophys.Res.Commun.164, 567-574; (1989) Arimura, A.et.al., Regul.Peptides 37, 287-303 (1992)). Although PACAP isolated at the beginning consisted of 38 amino acid residue (array number 1), it also became clear that PACAP which consists of amino-terminus side 27 residue (array number 2) exists.

[0017]

(Array number 1)

His-Ser-Asp-Gly-Ile Phe Thr Asp Ser Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys Gln 1 5 10
15Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val-Leu-Gly-Lys-Arg Tyr Lys 20 25
30Gln-Arg-Val Lys Asn Lys-NH2 35 [0018]

(Array number 2)

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln 1 5 10 15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu-NH2 20 25 [0019] Both

adenylate-cyclase activation ability is almost equivalent, and the former (array number 1) is called PACAP38, and it is calling the latter (array number 2) PACAP27. It is shown clearly that PACAP which furthermore has the completely same structure as a sheep also in Homo sapiens is discovered, and it is suggested that it is the important peptide saved over the seed.

[0020] In this invention, the variant gene of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene can also be used. A variant gene means what variation (for example, mutation etc.) produced in the DNA array of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and, specifically, the gene in which a part of base sequence in this gene suffered a loss, the gene by which a part of base sequence of this gene was permuted by other base sequences, the gene by which other base sequences were inserted in this a part of gene can be used. Although especially the number of the bases suffered [a loss] for which, permuted or added is not limited, generally it is about one to six pieces more preferably about 15 pieces in 1 about 50 pieces from 1. By the deficit, the permutation, or addition of such a base sequence, in the amino acid sequence of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide, there is no 1 preferably and about five the deficits, the permutations, or addition of 1 or about two amino acid will arise more preferably. In addition, it is desirable to use what is carrying out the code of the polypeptide which has a function equivalent to the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide of a natural mold as these variant genes.

[0021] With the "hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene" said on these descriptions, it has the largest semantics that includes not only the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene of a natural mold but all the variant genes that were described above.

[0022] As a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene used by this invention, if it is a mouse hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene and the gene of the mammalian origins which have homology, such as a rat and a rabbit, the thing of arbitration can be used. The hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene is well-known (Yamamoto K, Hashimoto H, Hagihara N, Nishino A, Fujita T, Matsuda T, Baba A. Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene*. 1998, 211(1):63-9). Moreover, it can also isolate with a conventional method by designing a suitable probe or a suitable primer based on the information on the amino acid sequence indicated for the array numbers 1 and 2 of an array table, and screening a suitable cDNA library.

[0023] (2) Especially the production approach of the transgenic nonhuman mammal of production this invention of the transgenic nonhuman mammal of this invention is producible by, for example, crossing the transgenic

nonhuman mammal which discovers this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation, although not limited.

[0024] (A) Explain the production approach of the transgenic nonhuman mammal which discovers this polypeptide by installation of transgenic nonhuman mammal point ** which introduced the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene.

[0025] It is desirable to use the recombination gene which connected the above-mentioned hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene with the lower stream of a river of the suitable promotor for mammals as an introductory gene used for production of a transgenic nonhuman mammal. A poly A signal can be connected with the lower stream of a river of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene concerned by request.

[0026] Although especially the class of the promotor for mammals and poly A signal which are used for construction of an introductory gene is not restricted, the promotor of a virus (example, cytomegalovirus, MORONI leukemia virus, JC virus, milk oncogenic virus, etc.) origin gene promotor, various mammals (an example, Homo sapiens, a rabbit, a dog, a cat, a guinea pig, a hamster, a rat, mouse, etc.), and the birds (example, fowl, etc.) origin etc. is used, for example.

[0027] As a promotor of each mammal and the birds origin For example, an insulin, albumin, endothelin, osteocalcin, Muscle creatine kinase, a collagen I-beam, and II mold, A cyclic AMP dependence protein kinase beta subunit (The Journal of Biological Chemistry, Vol.271, No.3, p.1638-1644, 1996), An atrium natriuresis sex factor, a dopamine-beta-hydroxylase, Neurofilament light chain () [The Journal] of Biological Chemistry, Vol.270, No.43, p.25739-25745, 1995, and ** Vol.272, No.40, and pp25112- 25120 and 1997 --- Metallothionein, METARO protease 1 organization inhibitor, a smooth muscle alpha actin, Promoters, such as polypeptide chain elongation factor 1alpha (EF-1alpha), beta actin, alpha and beta myosin heavy chain, myosin light chains 1 and 2, myelin basic protein, a blood serum amyloid P component, and renin, are used. Especially the thing for which the insulin (for example, human insulin) promotor who can carry out a high manifestation by the pancreas in this invention also in these is used is suitable.

[0028] Furthermore, a terminator required for hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene expression may be connected with the recombination gene used by this invention. In a transgenic animal, this terminator is used as an array (the so-called poly A) which ends the imprint of messenger RNA made into the object, and the array of each gene of the

virus origin, various mammals, or the birds origin can use it. Specifically, SV40 TANTINETA of a simian virus etc. is used. In addition, the splicing signal of a known gene and an enhancer field can be connected in order to carry out the high manifestation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene further. Furthermore, it is also possible to connect a part of intron of an eukaryote gene with 5' upstream of promoterregion on 3' lower stream of a river of between promoterregion and a translation field or a translation field.

[0029] If the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene included in the above-mentioned introductory gene is discovered by intracellular [, such as a fertilized egg,], a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene will come to be produced by intracellular.

[0030] The transgenic nonhuman mammal which discovers this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene can introduce a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene into the fertilized egg of a nonhuman mammal, can transplant the fertilized egg concerned to a pseudopregnancy feminity nonhuman mammal, and can produce it by making it give birth to the nonhuman mammal into which the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene was introduced from the nonhuman mammal concerned.

[0031] As a nonhuman mammal, although a fowl besides rodents, such as a mouse, a hamster, a guinea pig, a rat, and a rabbit, a dog, a cat, a goat, a sheep, a cow, Buta, an ape, etc. can be used for example, it sees from viewpoints, such as simplicity of production, training, and an activity, rodents, such as a mouse, a hamster, a guinea pig, a rat, and a rabbit, are desirable, and a mouse is the most desirable also in it.

[0032] The transgenic nonhuman mammal used by this invention is created when a germinal cell, and a reproductive cell or a somatic cell introduces the recombination gene which contains the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene of foreignness in the ancestor of a nonhuman mammal or this animal in the phase (and generally [in the phase / Preferably / of a single cell or an amphicytula] 8 cell terms or before) of an embryogenesis. Construction of the recombination gene containing a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene is as having described above.

[0033] Installation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene in an amphicytula phase is performed so that it may exist in all the germinal cells of object mammalian, and somatic cells and may be maintained. In the germinal cell of the creation animal after transgenics, as for a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene existing, all the progenies of a creation animal mean that a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene exists in all the germinal cell and somatic cells.

The descendant of this kind that inherited the gene of animal has a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene in all that germinal cell and somatic cells.

[0034] The transgenic animal of this invention can check holding a gene to stability by mating, and passage breeding can be carried out in the usual breeding environment as the gene possession animal concerned. The homozygote animal which has an introductory gene in both homologues can be acquired, and by crossing the animal of this sex, a propagation passage can be carried out so that all descendants may have this gene superfluously. In order to identify a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene expression part, hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene expression is observable on each level of an individual, an organ, an organization, and a cell. Moreover, it is also possible to measure extent of the manifestation with the enzyme immunoassay using the antibody of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide.

[0035] The case where a transgenic nonhuman mammal is a transgenic mouse is hereafter mentioned as an example, and it explains concretely. After building the introductory gene which contains cDNA which carries out the code of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide on a promotor's lower stream of a river, carrying out the microinjection of this introductory gene to the male pronucleus of a mouse fertilized egg and cultivating the obtained ootid, it can transplant to the uterine tube of a pseudopregnancy femininity mouse, and a transgenic mouse can be produced by breeding a transplanted animal after that and choosing the ** mouse which has said cDNA from the produced ** mouse. The thing of arbitration can be used if it is obtained as a fertilized egg of the above-mentioned mouse by mating of the mouse originating in C57BL [129/sv and]/6, BALB/c, C3H, SJL/Wt, etc., for example.

[0036] Moreover, 100 to 3000 molecule is suitable for the number of the introductory genes to pour in per fertilized egg. And selection of the ** mouse which has cDNA can be performed again by the dot hybridization method which uses as a probe the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene which extracted and introduced DNA from the tail of a mouse etc., the PCR method using a specific primer, etc.

[0037] (B) Explain the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by the genetic manipulation used for production of the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation, next the transgenic nonhuman mammal of this invention.

[0038] The diabetes mellitus which is the various metabolic errors centering on the disorders of carbohydrate metabolism caused by relative or absolute lack of an insulin operation is roughly classified into two, insulin dependent

diabetes mellitus (I-beam: IDDM) and insulin non-dependency diabetes mellitus (II mold: NIDDM). Destruction of a beta-cell of islet advanced by the autoimmunity-mechanism, and the symptoms of insulin dependent diabetes mellitus were shown by causing insulin secretion lowering, and on the other hand, the insulin resistance by obesity joined disposition of the insulin resistance in hereditary insulin secretion lowering and hereditary skeletal muscle, insulin non-dependency diabetes mellitus resulted in the onset, and this insulin non-dependency diabetes mellitus forms 95% or more of all diabetes mellitus.

[0039] As diabetes mellitus which the cause understands on current and gene level, there is diabetes mellitus by insulin unusual **, the insulin receptor abnormality, glucokinase ***** (MODY2), and the abnormalities in a mitochondrial DNA etc., and the location on the chromosome of the gene of MODY1, MODY3, NIDDM1, and NIDDM2 is mapped by chain analysis. The transgenic animal model of the diabetes-mellitus model mouse (KKAy mouse; available from Japanese Clare) produced by introducing an obesity gene Ay gene into KK mouse as a diabetes-mellitus model animal on the other hand, a NOD (non-obese diabetic) mouse, the diabetes-mellitus generating transgenic mouse which introduced into the mouse the diabetes-mellitus developmental genetics which has thermal shock protein 70 gene combined with a human insulin gene promotor's lower stream of a river, and II mold diabetes mellitus etc. is proposed.

[0040] In this invention, if it is the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation which was described above, the thing of arbitration can be used. Also in these, especially a desirable thing is the diabetes-mellitus model mouse (KKAy mouse; available from Japanese Clare) produced by introducing an obesity gene Ay gene into KK mouse. Moreover, it may newly produce by the approach according to the approach which described above the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation on these descriptions, and it may be used.

[0041] In this invention, the transgenic nonhuman mammal characterized by discovering this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation is producible by crossing the transgenic nonhuman mammal which discovers this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene, and the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation.

[0042] The transgenic nonhuman mammal of this invention is characterized

by showing the symptoms of diabetes mellitus, and is a model available to the screening trial of a diabetic remedy or preventive, and is useful also in areas of research, such as a break through of diabetic developmental mechanics, at the same time it carries out the superfluous manifestation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide.

[0043] Moreover, as some transgenic nonhuman mammals of above-mentioned this invention, a head besides the cell of a nonhuman mammal, an intracellular organelle, an organization, and an organ, a finger, a hand, a guide peg, an abdomen, a tail, etc. are mentioned, and these also all belong within the limits of this invention.

[0044] (3) While the therapy of the diabetes mellitus by screening this invention of a diabetic therapy agent and/or preventive and/or the screening approach of preventive carry out the superfluous manifestation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide, they can perform showing the symptoms of diabetes mellitus using the transgenic nonhuman mammal by which it is characterized. That is, the diabetes-mellitus curative effect and preventive effect of this specimen material can be evaluated by medicating the transgenic nonhuman mammals (for example, transgenic mouse etc.) of the diabetes-mellitus onset nature of this invention with a specimen material, measuring the blood sugar level of the blood which collected blood from the urine sugar value of the urine obtained from this transgenic nonhuman mammal, the root or a tail of an eyeball, etc., or examining the survival rate of the animal concerned. Or the diabetes-mellitus curative effect and preventive effect of this specimen material can also be evaluated by medicating the transgenic nonhuman mammal of this invention with an examined substance, and analyzing the manifestation condition of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide after administration, and a moving state in the living body again.

[0045] That is, by using the transgenic nonhuman mammal of this invention, it is possible to evaluate the curative effect and preventive effect of diabetes mellitus or those complication, and the transgenic nonhuman mammal of this invention can be used as a diabetic symptoms assessment model animal. For example, it is also possible to judge these symptoms recovery and critical extent, and to consider the therapy approach of this disease using the transgenic nonhuman mammal of this invention.

[0046] By using the transgenic nonhuman mammal of this invention, the superfluous manifestation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide is able to examine whether improvement effects, such as the above-mentioned disease, can be demonstrated, and the mechanism of these diseases can be solved further again.

[0047] As an examined substance with which the screening approach of this invention is presented, a peptide, protein, a nonpeptidic compound, a

synthetic compound, a fermentation product, a cell extract, a vegetable extract, an animal tissue extract, plasma, etc. may be mentioned, and these compounds may be new compounds and may be well-known compounds, for example. Moreover, libraries containing many molecules, such as a peptide library and a compound library, can also be used as an examined substance.

[0048] As an approach of medicating the transgenic nonhuman mammal of this invention with an examined substance, internal use, an intravenous injection, etc. are used, for example. Moreover, the dose of an examined substance can be suitably chosen in accordance with the property of a medication method and an examined substance etc. In the screening approach of this invention, when the urine sugar value and the blood sugar level in this transgenic nonhuman mammal decrease when the transgenic nonhuman mammal of this invention is medicated with an examined substance, or a survival rate improves, this examined substance can be chosen as matter which has a preventive effect or a curative effect to diabetes mellitus.

[0049] since the matter obtained using the screening approach of this invention is matter chosen from the above-mentioned examined substance and it has prevention and a curative effect to diabetes mellitus, diabetes mellitus is received -- safe -- low -- it can be used as remedies, such as toxic therapy, preventive, etc. Furthermore, the compound guided from the matter obtained by the above-mentioned screening can be similarly used as a remedy. The matter obtained by this screening approach has the desirable acid addition salt which the salt may be formed, and a salt with an acid (for example, an inorganic acid, an organic acid) or a base (for example, alkali metal) permitted physiologically is used as a salt of this matter, and is especially permitted physiologically.

[0050] As a salt, a salt with an inorganic acid (for example, a hydrochloric acid, a phosphoric acid, a hydrobromic acid, a sulfuric acid) or a salt with an organic acid (for example, an acetic acid, a formic acid, a propionic acid, a fumaric acid, a maleic acid, a succinic acid, a tartaric acid, a citric acid, a malic acid, oxalic acid, a benzoic acid, methansulfonic acid, benzenesulfonic acid) is used, for example.

[0051] The matter obtained by this screening approach can be parenterally used in the form of injections, such as water, an axenic solution with the other liquid which can be permitted pharmacologically, or a suspension agent, in taking orally as the tablet and capsule which gave glycocalyx if needed, elixirs, a microcapsule agent, etc.

[0052] For example, pharmaceutical preparation can be manufactured by mixing with this matter together with the support permitted physiologically, a flavor agent, an excipient, a vehicle, antiseptics, a stabilizer, a binder, etc. As an additive which can mix with a tablet, a capsule, etc., a flavor agent like

plumping agents, such as gelatin, corn starch, tragacanth, a binder like gum arabic, an excipient like a crystalline cellulose, corn starch, gelatin, and an alginic acid, lubricant like magnesium stearate, cane sugar, a lactose or a sweetening agent like saccharin, peppermint, a dirt mono-oil, or a cherry etc. is used, for example. The sterile constituent for injection can prescribe natural appearance vegetable oil, such as an active substance in a vehicle like water for injection, sesame oil, and coconut oil, etc. according to a conventional method, such as making it dissolve or suspend etc. As aqueous liquid for injection, the isotonic solutions (for example, D-sorbitol, D-mannitol, a sodium chloride, etc.) containing the adjuvant of a physiological saline, grape sugar, or others etc. are used, for example, and a suitable solubilizing agent (for example, ethanol), for example, alcohol, polyalcohol (for example, propylene glycol, a polyethylene glycol), a nonionic surfactant (for example, polysorbate 80 TM, HCO-50), etc. can also be used together. As oily liquid, sesame oil, soybean oil, etc. are used and benzyl benzoate, benzyl alcohol, etc. which are a solubilizing agent may be used together, for example.

[0053] Moreover, a buffer (for example, a phosphate buffer, the sodium acetate buffer solution), aprotinized agents (for example, a benzalkonium chloride, procaine hydrochloride, etc.), stabilizers (for example, a human serum albumin, a polyethylene glycol, etc.), preservatives (for example, benzyl alcohol, a phenol, etc.), an antioxidant, etc. may be blended with an above-mentioned diabetic therapy agent and/or preventive.

[0054] Thus, the pharmaceutical preparation obtained is safe, and since it is low toxicity, a medicine can be prescribed for the patient to Homo sapiens or mammalian, for example. Although it is different with the administration route of an object disease and for administration etc., generally the dose of this matter prescribes preferably about 0.1–100mg of about 1.0–50mg of these compounds for the patient per day in an adult, for example, when administering orally. When prescribing a medicine for the patient parenterally, the 1-time dose of this compound changes with object diseases for administration etc., but when usually medicating an adult in the form of injections, about about 0.01–100mg about about 0.1–50mg is preferably prescribed for the patient for this compound by the intravenous injection per day, for example.

[0055] (4) The physiological function of the drugs hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide (PACAP) using the gene which carries out the code of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide or it changes with existence parts and is various. Various things, such as acceleration of secretion of GH, ACTH, PRL, and LH, production of cAMP in adrenal medulla pheochromocytoma origin cell PC12h and acceleration of neural spine expanding, acceleration of production of the

interleukin -6 in a hypophysis cultured cell, and acceleration of cAMP production in rat astrocytic primary culture, acceleration of a nerve cell death inhibition operation in the acceleration of production of cAMP and the rat hypophysis super fusion method in a rat hypophysis primary culture cell, are reported as an operation of PACAP until now.

[0056] That a PACAP immunity positivity nerve projects on a pancreatic islet in the pancreas, the manifestation of VPAC2 acceptor which shows compatibility comparable to PACAP to both PAC1 with high compatibility acceptor, and PACAP and VIP among PACAP acceptor subtypes being seen by the pancreas beta cell, and the thing of 10-14M for the glucose inductivity insulin secretion from a isolation pancreatic islet extremely promoted by low concentration are known. Moreover, PACAP(s) are various cells, and since it has cytoprotection or differentiation, and an acceleration operation of growth, it is predicted that such an operation is seen also in a pancreas beta cell. However, the operation to the pancreatic islet of PACAP in in vivo had many points which are not clear.

[0057] this invention persons discover this polypeptide by installation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene under the situation of having described above. And the transgenic nonhuman mammal characterized by showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation is used. By carrying out the superfluous manifestation of the place and hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide which examined what kind of operation a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide would exert on the saccharometabolism in diabetes-mellitus symptoms in a body The organ weight of the pancreas became large and it found out that the hypermorphosis of a pancreatic islet was controlled for the first time.

[0058] That is, it newly became clear by carrying out the superfluous manifestation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide in a diabetic's body that growth of the pancreas could be promoted this time.

[0059] Therefore, according to this invention, the drugs for the acceleration of playback of the pancreas tissue which contains a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide as an active principle, or formation control of a pancreatic islet are offered. With the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide said here, it has not only the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide of a natural mold but the largest semantics that includes all the variants that carried out the account of this description Nakagami.

[0060] As a mammals animal which can be treated with the drugs of this invention, a cow, Buta, a sheep, an ape, a dog, a cat, rodent animals (for example, laboratory animal etc.), Homo sapiens, etc. are mentioned, for example. As a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide,

PACAP38, PACAP27, those variants, analogs (analog), such agonists (agonist), etc. can be used. PACAP38, PACAP27, those variants, analogs (analog), and such agonists (agonist) can be manufactured by the well-known approach to this contractor.

[0061] When manufacturing a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide by chemosynthesis, it can compound with the conventional method means of composition of a peptide. for example, an azide method, the acid chloride method, an acid-anhydride method, a mixed acid anhydride method, and DOC — law, the activity ester method, the KARUBO imidazole method, an oxidation reduction method, etc. are mentioned. Moreover, the composition can apply both a solid phase synthesis method and a liquid phase synthesis method. That is, condensation of the amino acid and residual part which can constitute a peptide or its salt is carried out, and when a product has a protective group, the peptide made into the object or its salt can be compounded by being desorbed from a protective group. They are the foundation of peptide synthesis and an experiment besides M and M.A.Ondetti, [, for example, Bodanszky, which may use the condensation approach and which technique well-known as desorption of a protective group, PeptideSynthesis, Interscience Publishers, New York (1966), Schroeder and Luebke, The Peptide, AcademicPress, New York (1965), and Izumi store Nobuo, Maruzen (1975), etc. Reference]

[0062] After a reaction can refine the peptide made into the object, or its salt by combining the usual purification method, for example, solvent extraction, distillation, a column chromatography, liquid chromatography, recrystallization, etc.

[0063] The approach of rearranging the amino acid sequence of the peptide concerned in hosts, such as a microbial cell, a plant cell, and an animal cell, as the another manufacture approach of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide using the gene which carries out a code by the gene engineering-technique, and producing as protein (peptide) is mentioned. The obtained rough synthetic peptide can be refined using the means used for usual protein or peptide purification, such as gel filtration, an opposite phase HPLC, and ion exchange column purification.

[0064] A hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide is the form which various kinds of solid supports which come out as it is or are regularly used with pharmaceutical preparation, liquid support, an emulsification dispersant, etc. were made to contain, and can be used as drugs for promoting the drugs for controlling formation of the pancreatic islet in a diabetic or the patient of diseases of pancreas (for example, pancreatitis, acceleration of pancreas playback after focus extraction of a pancreatic cancer, etc.), and the rebirth of a pancreatic tissue. A hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide with the gestalt of a remedy

constituent In using it as drugs for promoting the drugs for controlling formation of the pancreatic islet in a diabetic or the patient of diseases of pancreas (for example, pancreatitis, acceleration of pancreas playback after focus extraction of a pancreatic cancer, etc.), and the rebirth of a pancreatic tissue The formulation can be suitably chosen according to the purpose of use or the object for an activity, for example, can be used with gestalten, such as a tablet, a pill, powder, liquids and solutions, suspension, an emulsion, a granule, a capsule, suppositories, and injections (liquids and solutions, suspension, etc.).

[0065] moreover, as support used on the occasion of tablet formation For example, a lactose, white soft sugar, a sodium chloride, grape sugar, a urea, starch, calcium carbide, The starch in which excipients, such as a kaolin, crystalline cellulose, and a silicic acid, water, or alcohols was included, Gelatin, carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na), Methyl cellulose (MC), hydroxypropylcellulose (HPC), The hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), calcium phosphate, Binders, such as a polyvinyl pyrrolidone, desiccation starch, agar pulveratum, the end of a laminaran, A sodium hydrogencarbonate, a calcium carbonate, and polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester Sodium lauryl sulfate, a stearin acid monoglyceride, starch, Disintegrator, such as a lactose, white soft sugar, stearin, cocoa butter, the breaking control agent of hydrogenated oil sugar, Lubricant, such as a polyethylene glycol, etc. can be used in adsorbents, such as a quarternary-ammonium-salt radical, a lauryl sulfuric-acid night, and a colloid silicic acid, purification talc, a stearate, and the end of a boric acid. Furthermore, a tablet can be used as the tablet which gave the usual coating if needed, for example, a glycocaryx lock, a gelatin encapsulation lock, an enteric coat film coated tablet or an auxiliary rim lock, and a multilayered tablet.

[0066] When preparing a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide as injections, liquids and solutions, an emulsion, and suspension are sterilized, and it is desirable that they are blood and an isotonicity, and they can be faced fabricating in these gestalten and can use water, ethyl alcohol, propylene glycol, ethoxylation isostearyl alcohol, polyoxy-ized isostearyl alcohol, and polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester as a diluent. It can also be used if needed, being able to blend a solution adjuvant besides preservatives, such as isotonizing agents, such as suspending agents, such as stabilizers, such as a sodium hydrogensulfite and a sodium pyrosulfite, a carboxymethyl cellulose, sodium alginate, and aluminum monostearate, a sodium chloride, grape sugar, and a glycerol, p-hydroxybenzoic esters, benzyl alcohol, and chlorobutanol, a buffer, an aponia-ized agent, etc.

[0067] Into the remedy constituent of each above-mentioned gestalt, the coloring agent used further commonly if needed, perfume, a flavor agent, a

sweetening agent, etc. can be blended, and other drugs active principles may be made to contain.

[0068] Mammalian including Homo sapiens can be medicated with a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide. Internal use or parenteral administration is sufficient as a route of administration. Although it should fluctuate suitably according to conditions, such as a patient's age, sex, weight, a symptom, and a route of administration, generally, the dose of the drugs of this invention is the range of 10 ng/kg to 1,000 mg/kg extent per adult day as an amount of active principles, and is the range of 10 mg/kg extent from 1microg/kg preferably. The above-mentioned dose may be prescribed for the patient one day, or a day may be medicated with it in several steps. Moreover, an administration period and especially administration spacing may not be limited, either, but a medicine may be prescribed for the patient every day, or may be prescribed for the patient at intervals of several days.

[0069] Moreover, a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide can also be used only as drugs, being able to blend with products other than the drugs taken in to the inside of the body of men, such as health food and feed, or an animal.

[0070] Furthermore, according to this invention, the pancreas tissue weight which contains the gene which carries out the code of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide as an active principle is increased, and the drugs for controlling the hypermorphosis of a pancreatic islet are offered. Pancreas weight can be increased by medicating the inside of the body with a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide as described above. Therefore, by medicating a diabetic's inside of the body with the gene which carries out the code of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide, the superfluous manifestation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide is carried out, pancreas tissue weight is increased by this, and the hypermorphosis of a pancreatic islet can also be controlled.

[0071] [whether the gene which carries out the code of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide is introduced into the patient of (1) disease of pancreas, and he is specifically made discovered, and] Or after introducing into the cell of (2) pancreas origin the gene which carries out the code of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide and making it discovered, by transplanting this cell to this patient etc. The hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide in the cell of this patient's pancreas can be made to be able to increase, and a PACAP operation can fully be demonstrated. Namely, the gene which carries out the code of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide can carry out the transformation of the cell of the pancreas by in vitro or in vivo, and, thereby,

it can be used for it as a gene therapy agent.

[0072] The above-mentioned gene therapy agent can be manufactured according to a stock-in-trade. For example, it can be parenterally used in the form of injections, such as water, an axenic solution with the other liquid which can be permitted pharmacologically, or a suspension agent, in taking orally as the tablet and capsule which gave glycocalyx if needed, elixirs, a microcapsule agent, etc. For example, it can manufacture by mixing with the gene which carries out the code of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide together with the support permitted physiologically, a flavor agent, an excipient, a vehicle, antiseptics, a stabilizer, a binder, etc.

[0073] As an additive which can mix with a tablet, a capsule, etc., a flavor agent like plumping agents, such as gelatin, corn starch, tragacanth, a binder like gum arabic, an excipient like a crystalline cellulose, corn starch, gelatin, and an alginic acid, lubricant like magnesium stearate, cane sugar, a lactose or a sweetening agent like saccharin, peppermint, a dirt mono-oil, or a cherry etc. is used, for example.

[0074] The sterile constituent for injection can prescribe natural appearance vegetable oil, such as an active substance in a vehicle like water for injection, sesame oil, and coconut oil, etc. according to the usual pharmaceutical preparation implementation of making it dissolve or suspend etc. The isotonic solutions (for example, D-sorbitol, D-mannitol, a sodium chloride, etc.) which contain the adjuvant of a physiological saline, grape sugar, or others as aquosity liquid for injection are raised, and you may use together with a suitable solubilizing agent (for example, ethanol), for example, alcohol, polyalcohol (for example, propylene glycol, a polyethylene glycol), a nonionic surfactant (for example, polysorbate 80, HCO-50), etc. Sesame oil, soybean oil, etc. are raised as oily liquid, and you may use together with benzyl benzoate, benzyl alcohol, etc. as a solubilizing agent. Moreover, you may blend with a buffer (for example, a phosphate buffer, the sodium acetate buffer solution), aponia-ized agents (for example, a benzalkonium chloride, procaine hydrochloride, etc.), stabilizers (for example, a human serum albumin, a polyethylene glycol, etc.), preservatives (for example, benzyl alcohol, a phenol, etc.), an antioxidant, etc.

[0075] Although it is different with a symptom etc., in internal use, generally in an adult, about 0.1mg - 100mg per day of 1.0-50mg of doses is 1.0-20mg more preferably (as 60kg). Although a dose changes with the object organ for administration, a symptom, medication methods, etc. once [the] when prescribing a medicine for the patient parenterally, it is convenient to usually prescribe more preferably about 0.01mg - about 30mg [per day] about 0.1-20mg about 0.1-10mg for the patient by the intravenous injection in an adult, for example in the form of injections (as 60kg). This invention is not limited by the example although the following examples explain this invention

still more concretely.

[0076]

[Example] Example 1 :P Production of the production (1) installation gene of an ACAP transgenic mouse (drawing 1)

a human insulin promotor's (1.9kb) 3' downstream — 3' of a rabbit beta globin gene — the side (1.7kb) was connected and united on the plasmid pAT153. Next, this fusion gene was digested with the restriction enzyme EcoRI, and a part of rabbit beta globin gene was permuted by the mouse PACAPcDNA including all translation fields. The fusion gene which removed the part of a vector was refined and it used for production of a transgenic mouse. The structure of the fusion gene used for production of a PACAP transgenic mouse at drawing 1 is shown.

[0077] (2) Production of a transgenic mouse (drawing 2)

The microinjection of the fusion gene produced above (1) was carried out to the pronucleus of the fertilized egg of BDF1 mouse (BDF1 male xBDF1 female). It transplanted to the oviduct of the recipient mouse which was made to cross the surviving fertilized egg with a spermatic duct ligation mouse beforehand, and changed it into the pseudopregnancy condition. The cesarean section was carried out after transplantation on the 19th, and the produced mouse was made to be bred into a foster parent mouse. After isolating Chromosome DNA from the tail by 4 weeks old of after the birth and carrying out full digestion with a restriction enzyme Pst1, genotype was judged by performing Southern blot analysis using Gene Images TM (Amersham) by using Mouse PACAPcDNA as a probe. The method of producing a transgenic mouse is shown in drawing 2 .

[0078] (3) Organ specificity of introductory gene expression (drawing 3)

Total RNA was extracted from each organ (lungs, a brain, the pancreas, heart, liver) of TRANS GENIC or a non transgenic mouse by the acid guanidinium-phenol-chloroform method. These RNA was transferred to the nitrocellulose membrane, after performing electrophoresis using 1.5% agarose / formaldehyde denatured gel. 32P indicator mouse PACAP produced by the random primer method Hybridization was performed using the cDNA probe. The result of hybridization is shown in drawing 3 . From the result of drawing 3 , it was proved that PACAP was discovered by the pancreas of a transgenic mouse.

[0079] (4) Immunohistochemistry (drawing 4)

From the heart of TRANS GENIC which did NEMUBU tar anesthesia, or a non transgenic mouse, 4% paraformaldehyde / 0.1% glutaraldehyde / 0.1M phosphate buffer solution was flowed in. The pancreas were extracted and it dipped in 4 more-degree C 30% cane sugar / 0.1M phosphate buffer solution at 4 degrees C with this fixing fluid on the 2nd on the 1st. The frozen section with a thickness of 15mm was produced using cryostat (Leitz) from these

fixed pancreas. The anti-PACAP rabbit polyclonal antibody and the FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody were used as a primary antibody and a second antibody, respectively. The speculum was carried out by confocal laser scanning microscope MRC-242 (Bio-Rad) after enclosing a sample. A result is shown in drawing 4 . From the result of drawing 4 , it was proved that PACAP was discovered by the pancreas of a transgenic mouse.

[0080] Example 2 :P Individual breeding of the mice of all the analysis (1) animals was carried out at production of the transgenic mouse of this invention by hereditary mating with an ACAP transgenic mouse and a KKAY mouse, and a list under the room temperature of 22*1 degree C, and breeding conditions of lighting 12 hours (8:00 – 20:00), and food and water were made to take in freely.

[0081] (2) Hereditary mating with a KKAY mouse (drawing 5)

A KKAY mouse (Japanese Clare) is a diabetes-mellitus model mouse produced by introducing an obesity gene Ay gene into KK mouse in 1969. Since a female KKAY mouse was sterility, it obtained the mouse of the 1st generation of hybridization (F1) by making the female of a PACAP transgenic mouse and the male of a KKAY mouse which were produced in the example 1 cross. PCR using the primer array which makes the PACAP fusion gene unique target which introduced amplify DNA extracted from the tail performed the judgment of +/- of four kinds of genotypes, Tg/+, Ay/+, and Tg/+:Ay/+ (C57BL/yes of 6 and KK Brit background). The male of F1 mouse was used for the experiment. Mendelian ratio predicted in each genotype was observed. The outline of production of F(KKAYxPACAP Tg)1 mouse is shown in drawing 5 .

[0082] (3) Immunohistochemistry (drawing 6)

The pancreas of each F1 mouse anesthetized by pentobarbital are extracted, and it is 4% paraformaldehyde/0.1 M It is 30% cane sugar / 0.1M at 4 degrees C in PBS. PBS was permeated on one to the 2nd. [one day and 4 more degrees C] From the fixed pancreas to cryostat (Leica) It used and the frozen section with a thickness of 15 micrometers was produced. About PACAP dyeing, the Texas red conjugation anti-rabbit IgG was used as a second antibody, using an anti-PACAP rabbit polyclonal antibody (Yanaihara Lab) as a primary antibody. The anti-insulin guinea pig polyclonal antibody (Dako) and the anti-glucagon rabbit polyclonal antibody (Dako) were used as a primary antibody, and the anti-FITC-conjugation anti-guinea pig IgG and the Rhodamine conjugation anti-rabbit IgG were used for the simultaneous stain of insulin and glucagon as a second antibody, respectively. The speculum was carried out with the fluorescence microscope (Nikon TE300) after enclosing a sample. Image analysis was performed using shape analysis software and Mac SCOPE (MITANI CORPORATION). A result is shown in drawing 6 .

[0083] In drawing 6 , although the pancreas of +/+ and Ay/+ adult mice do not contain the islet cell of PACAP immunoreactivity (A and C), a Tg/+ and Tg/+:Ay/+ mouse contains the islet cell dyed by PACAP (B and D). The manifestation of intracellular PACAP of each pancreatic islet is uneven. The graph of the drawing 6 bottom measures the PACAP content in the pancreas by the radioimmunoassay method. Tg/+: The increment in a pancreas PACAP content is checked in an Ay/+ mouse and a Tg/+ mouse.

[0084] (4) Measurement of weight, a plasma glucose value, a triglyceride value, and an insulin value (drawing 7)

About F1 mouse of each week-old shown in drawing 7 , it collected blood to 9:00-12:00. Blood collecting was performed from the caudal vein. The glucose value of the obtained plasma, the triglyceride value, and the insulin value were measured using Glu CII test (Wako), Triglyceride (INT) (SigmaDiagnostics), and Sensitive Rat Insulin RIA Kit (Linco), respectively. Moreover, weight was also measured about these F1 mouse. A result is shown in drawing 7 . The value in drawing 7 shows average**SE. ANOVA estimated statistical significance by the F test of Sheffe.

[0085] (5) Measurement of food consumption (drawing 8)

After installing a diet, the food intake was carried out to freedom for two weeks, and the difference with a residue was made into food consumption. The food which fell shall be disregarded. The measurement result of the food consumption of a 15-weeks old +/+ (n= 11), Tg/+ (n= 10), Ay/+ (n= 15), and Tg/+:Ay/+ (n= 17) mouse is shown in drawing 8 . The value in drawing 8 shows average**SE. ANOVA estimated statistical significance by the F test of Sheffe.

[0086] (6) Glucose tolerance test (drawing 9)

2 mg/g body weight after making F1 mouse of a brood abstain from food for 14 hours The glucose was prescribed for the patient in internal use or ****. Whole blood was extracted from the caudal vein of a mouse with time, and the plasma glucose value and the plasma insulin value were measured. A result is shown in drawing 9 . The value in drawing 9 shows average**SE. ANOVA estimated statistical significance by the F test of Sheffe.

[0087] (7) Insulin loading test (drawing 10)

After carrying out the fast (8:00 - 10:00) of the mouse of a brood with which week-old corresponded for 2 hours, the insulin of 2 Unit/kg body weight was prescribed for the patient in ****. It collected blood from the caudal vein with time, and the plasma glucose value was measured. A result is shown in drawing 10 . The value in drawing 10 shows average**SE.

[0088] (8) Organization morphological analysis (drawing 11)

Hematoxylin-eosin dyeing of the pancreas intercept with a thickness of 15 micrometers produced using CRYOSTAT (Leica) was carried out, and the intercept sample was produced. After photoing the produced intercept

sample under direct or a microscope using CHILLED CCD CAMERA (HAMAMATSU C5985), intercept area and all the pancreatic islet area that can be checked were measured in Mac SCOPE. A result is shown in drawing 11. Analysis was performed by $n=9-11$ per each genotype. In drawing 11, (C) shows the average of pancreatic islet area, (D) shows the number of the pancreatic islets per two a pancreas area of 1mm, (A) shows the mouse weight at the time of an autopsy, and (F) shows [(B) shows the pancreas wet weight at the time of an autopsy and / (E) shows the phase bigeminum product of a pancreatic islet to all the pancreas, and] the total pancreatic islet weight. The total pancreatic islet weight calculates pancreatic islet area / pancreas area from the analysis of an intercept, carries out this 3/square, and makes it a volume ratio. Furthermore, what applied the nature weight of the pancreas to this was made into the total pancreatic islet weight (Total islet volume). ANOVA estimated statistical significance by PLSD assay of Fisher.

[0089] (9) In the conclusion example 2, the first generation mouse of hybridization of a pancreas specific overPACAP manifestation transgenic mouse (Tg/+) and the KKAY mouse (Ay/+) which shows the symptoms of obesity and diabetes mellitus in a prepotence format was produced, and it analyzed about each phenotype. immunity -- in histological analysis, the PACAP immunity positivity cell was observed in the pancreatic islet of a Tg/+ mouse and the Tg/+ mouse (Tg/+:Ay/+) which has Ay allele.

[0090] In any of taking orally and an intraperitoneal glucose tolerance test, the big difference was not accepted in the glucose tolerance of +/+ and a Tg/+ mouse. Moreover, the big difference between an Ay/+ mouse and a Tg/+:Ay/+ mouse was not accepted. Moreover, in the oral glucose tolerance test, lifting of the plasma insulin value shown by AUCinsulin was the same with the Tg/+:Ay/+ mouse and the Ay/+ mouse. Therefore, it turned out that a Tg/+:Ay/+ mouse shows the same insulin secretion reactivity as an Ay/+ mouse.

[0091] Although the Tg/+:Ay/+ mouse showed the value with a low plasma insulin value from the above-mentioned result compared with the Ay/+ mouse, it was shown that insulin susceptibility and insulin secretion ability are equivalent. Furthermore, as shown in drawing 11, as a result of analyzing the pancreatic islet of these F1 mice morphologically by hematoxylin-eosin staining, the inclination for the amount of the pancreatic islet in a Tg/+:Ay/+ mouse to become smaller than an Ay/+ mouse was shown.

[0092]

[Effect of the Invention] The transgenic nonhuman mammal characterized by discovering this polypeptide by installation of the hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide gene offered by this invention, and showing the symptoms of diabetes mellitus by genetic manipulation is useful

because of a break through of a diabetic onset device, and screening of diabetic preventive or a therapy agent as a diabetes-mellitus onset model animal by which pancreas tissue weight was increased by the manifestation of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide, and the hypermorphosis of a pancreatic islet was controlled. Moreover, according to this invention, it became possible to newly offer the drugs for promoting the drugs for controlling formation of the pancreatic islet in a diabetic or the patient of diseases of pancreas (for example, pancreatitis, acceleration of pancreas playback after focus extraction of a pancreatic cancer, etc.) which contains the gene which carries out the code of a hypophysis adenylate-cyclase activation polypeptide or it as an active principle, and the rebirth of a pancreatic tissue.

[0093]

[Layout Table]

SEQUENCE LISTING <110> Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.<120>

Transgenic non-human mammal<130> A21060A <160> 2[0094]

<210> 1<211> 38<212> PRT<213> sheep<400> 1His Ser Asp Gly Ile Phe Thr
Asp Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg Lys Gln 1 5 10 15Met Ala Val Lys Lys Tyr
Leu Ala Ala Val-Leu-Gly-Lys-Arg Tyr Lys 20 25 30 Gln Arg Val Lys Asn Lys
35 [0095]

<210> 2<211> 27<212> PRT<213> sheep<400> 2His Ser Asp Gly Ile Phe Thr
Asp Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg Lys Gln 1 5 10 15Met Ala Val Lys Lys Tyr
Leu Ala Ala Val Leu 20 25

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing 1 shows the structure of the fusion gene used for production of a PACAP transgenic mouse.

[Drawing 2] Drawing 2 shows the method of producing a transgenic mouse.

[Drawing 3] Drawing 3 shows the result of having investigated the organ specificity of a PACAP manifestation by NOZAN blotting analysis.

[Drawing 4] Drawing 4 shows the result of immunity dyeing using the anti-PACAP antibody in the pancreas of a transgenic mouse and a non transgenic mouse.

[Drawing 5] Drawing 5 shows the outline of production of F(KKAyxPACAP Tg)1 mouse.

[Drawing 6] Drawing 6 shows the result of immunohistochemistry analysis of F1 mouse pancreas cell.

[Drawing 7] Drawing 7 shows the measurement result of the weight of F1 mouse, a plasma glucose value, a plasma triglyceride value, and a plasma insulin value.

[Drawing 8] Drawing 8 shows the measurement result of the food consumption of a 15-weeks old +/+ (n= 11), Tg/+ (n= 10), Ay/+ (n= 15), and Tg/+;Ay/+ (n= 17) mouse.

[Drawing 9] Drawing 9 shows the result of the glucose tolerance test in F1 mouse.

[Drawing 10] Drawing 10 shows the result of the insulin loading test in F1 mouse.

[Drawing 11] drawing 11 -- an adult -- the result of the organization morphological analysis of the pancreatic islet in F1 mouse is shown.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-304778

(P2003-304778A)

(43) 公開日 平成15年10月28日 (2003. 10. 28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 0 1 K 67/027	Z N A	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/22		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
45/00		48/00	4 C 0 8 4
48/00		A 6 1 P 1/18	4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/18		3/10	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-111852(P2002-111852)

(22) 出願日 平成14年4月15日 (2002. 4. 15)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年10月20日 発行の「日本薬理学雑誌 118巻 補冊1」に発表

(71) 出願人 000002819

大正製薬株式会社

東京都豊島区高田3丁目24番1号

(71) 出願人 500180444

馬場 明道

兵庫県西宮市門戸荘17-12-1305

(72) 発明者 馬場 明道

兵庫県西宮市門戸荘17-12-1305

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニック非ヒト哺乳動物

(57) 【要約】

【課題】 in vivoにおけるPACAPの膵島への作用を解明するのに有用なモデル動物を提供すること。

【解決手段】 下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現し、かつ遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現し、かつ遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

【請求項2】 下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを膵臓で過剰発現する、請求項1に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

【請求項3】 下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物と、遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物とを交配することによって作製される、請求項1又は2に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

【請求項4】 (1) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも低い血漿インスリン値を示し；(2) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも、膵臓の臓器重量が大きく；及び／又は(3) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも、膵臓ランゲルハンス島(膵島)の過形成が抑制されている：ことを特徴とする、請求項1から3の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

【請求項5】 非ヒト哺乳動物がマウスである、請求項1から4の何れかに記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部。

【請求項6】 請求項1から5の何れかに記載の非ヒト哺乳動物またはその一部を用いることを特徴とする、糖尿病の治療剤及び／又は予防剤のスクリーニング方法。

【請求項7】 請求項6に記載のスクリーニング方法により得られる物質。

【請求項8】 請求項6に記載のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分として含有する、糖尿病の治療剤及び／又は予防剤。

【請求項9】 下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド又はそれをコードする遺伝子を有効成分として含む、膵臓組織の再生促進あるいは膵島の形成制御のための薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、トランスジェニック非ヒト哺乳動物に関する。より詳細には、本発明は、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現することを特徴とする糖尿病発症モデルのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に関する。本発明はまた、下垂体アデニレートシク

ラーゼ活性化ポリペプチド又はそれをコードする遺伝子の利用にも関する。

【0002】

【従来の技術】下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド(Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PACAP)は、セクレチン/グルカゴン/vasoactive intestinal polypeptide(VIP)ファミリーに属する神経ペプチドで、その生理作用は下垂体・副腎髄質ホルモンの合成・分泌調節や神経細胞・性細胞の分化・成長促進作用など多彩な役割を担うことが知られている(橋本 均、馬場 明道：ニューロペプチドPACAP受容体の構造と機能 別冊・医学のあゆみ、2001、7回膜貫通型受容体研究の新展開 79-84 橋本 均、馬場 明道)。

【0003】膵臓においてはPACAP免疫陽性神経が膵島に投射すること、PACAP受容体サブタイプのうちPACAPに親和性の高いPAC₁受容体と、PACAPとVIPの両者に同程度の親和性を示すVPAC₂受容体の発現が膵臓β細胞にみられること、並びに、単離膵島からのグルコース誘導性インスリン分泌を10⁻¹⁴Mという極めて低濃度で促進することが知られている。また、PACAPは様々な細胞で、細胞保護作用、あるいは分化や増殖の促進作用を持つことから、膵臓β細胞においてもこのような作用が見られることが予測される。

【0004】しかしながら、上記のように、PACAPは生体内で様々な作用を持つため、PACAP投与による糖代謝について調べた実験ではその結果の解釈は複雑となっている(Filipsson K, Pacini G, Scheurink AJ, Ahren B.: PACAP stimulates insulin secretion but inhibits insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol* 1998 May 274(5 Pt 1):E834-42)。

【0005】また、PACAPシグナル系には未だに選択的な低分子アゴニストが存在しないことなどから、in vivoにおけるPACAPの膵島への作用は明らかになっていない点が多い。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、in vivoにおけるPACAPの膵島への作用を解明するのに有用なモデル動物を提供することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、in vivoにおけるPACAPの膵島への作用を解明することにより、PACAPを医薬品として活用することを解決すべき課題とした。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明に先立って、本発明者らは、PACAPが膵臓においてどのような作用を示すかをin vivoで調べることを目的として、ヒトインスリンプロモーター制御下で膵臓特異的にPACAPを過剰発現させるトランスジェニックマウス(Tg/+)を作製し、このマウスが同腹の野生型(+ / +)マウス

より高いインスリン分泌能を示すことを見出していた。

【0008】この知見を基にして、本発明者らはさらに、PACAPが糖尿病モデル動物の膵臓においてどのような作用を示すかをin vivoで調べることを目的として、優性遺伝形式で肥満及び糖尿病を発症するagouti yellow マウス (Ay/+) と Tg/+ マウスとの掛け合わせによって得られる、4種類の遺伝型のマウス (+/+、Tg/+、Ay/+、Tg/+ : Ay/+) を解析することにより、糖尿病病態において、PACAPが糖代謝にどのような作用を及ぼすかについて検討を行った。さらに、本発明者らは、組織学的解析から、PACAPが糖尿病病態において膵島の形態にどのような影響を与えるかについても検討を加えた。

【0009】上記検討の結果、本発明者らは、Tg/+ : Ay/+ マウスではAy/+ マウスに比べ、膵臓重量が大きくなっており、膵島重量が小さくなっていることを今回初めて見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0010】即ち、本発明によれば、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現し、かつ遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部が提供される。

【0011】本発明の好ましい態様によれば、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを膵臓で過剰発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部；下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物と、遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物とを交配することによって作製されるトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部；

(1) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも低い血漿インスリン値を示し、(2) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも大きい膵臓臓器重量を示し；及び/又は

(3) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも、膵臓ランゲルハンス島 (膵島) の過形成が抑制されていることを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部；並びに非ヒト哺乳動物がマウスであるトランスジェニック非ヒト哺乳動物またはその一部；が提供される。

【0012】本発明の別の側面によれば、上記何れかの非ヒト哺乳動物またはその一部を用いることを特徴とする、糖尿病の治療剤及び/又は予防剤のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法により得られる物質、並びに、当該スクリーニング方法により得られる物質を有効成分として含有する、糖尿病の治療剤及び/又は予防

剤が提供される。本発明のさらに別の側面によれば、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド又はそれをコードする遺伝子を有効成分として含む、膵臓組織の再生促進あるいは膵島の形成制御のための薬剤が提供される。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の特徴

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現し、かつ遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とし、好ましくは、遺伝子導入により、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを膵臓で過剰発現する。

【0014】特に好ましい態様によれば、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも、膵島の過形成が抑制されていることを含めた膵臓の構造異常を特徴とする。本明細書で言う「膵島の過形成が抑制されていることを含めた膵臓の構造異常」とは、より具体的には、以下の(1)～

(3)の何れか1以上、好ましくは以下の(1)～(3)の全ての特徴を示す状態を意味する。

(1) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも低い血漿インスリン値を示す；

(2) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも、膵臓の臓器重量が大きい；及び/又は

(3) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物よりも、膵臓ランゲルハンス島 (膵島) の過形成が抑制されている (即ち、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物から摘出した膵臓より、薄切片を作製し検鏡した場合に観察される単位膵臓面積における膵島の数が減少している) ；

【0015】本明細書で言う「下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子」とは、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドをコードする遺伝子であり、哺乳動物の下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子、並びに、これらの遺伝子と同じ機能を有する変異体遺伝子の全てを包含する。

【0016】下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) は下垂体のアデニレート・サイクレーズ活性を促進させるペプチドとして、ヒツジ視床下部より初めて単離された (Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 567-574 (1989); Arimura, A. et.al., Regul. Peptides 37, 287-303(1992))。当初単離された

PACAPはアミノ酸残基38個(配列番号1)からなるものであったが、アミノ末端側27残基(配列番号2)からなるPACAPが存在することも明らかになっ

(配列番号1)

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Arg	Tyr	Lys
			20					25					30		
Gln	Arg	Val	Lys	Asn	Lys-NH ₂										
			35												

【0018】

(配列番号2)

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1				5					10					15	
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu-NH ₂					
			20					25							

【0019】両者のアデニレート・シクラーゼ活性化能はほぼ同等で、前者(配列番号1)をPACAP38、後者(配列番号2)をPACAP27と呼んでいる。さらにヒトにおいてもヒツジと全く同一の構造を有するPACAPが発現されていることが明らかにされ、種を越えて保存された重要なペプチドであることが示唆されている。

【0020】本発明では、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の変異体遺伝子を使用することもできる。変異体遺伝子とは、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子のDNA配列に変異(例えば、突然変異など)が生じたものを意味し、具体的には、該遺伝子中の塩基配列の一部が欠損した遺伝子、該遺伝子の塩基配列の一部が他の塩基配列で置換された遺伝子、該遺伝子の一部に他の塩基配列が挿入された遺伝子などを用いることができる。欠損、置換または付加される塩基の数は、特に限定されないが、一般的には1から50個程度、好ましくは1から15個程度、より好ましくは1から6個程度である。このような塩基配列の欠損、置換または付加によって、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドのアミノ酸配列において、好ましくは1ないし5個程度、より好ましくは1または2個程度のアミノ酸の欠損、置換または付加が生ずることになる。なお、これらの変異体遺伝子としては、天然型の下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドと同等の機能を有するポリペプチドをコードしているものを使用することが好ましい。

【0021】本明細書で言う「下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子」とは、天然型の下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子のみならず、上記したような変異体遺伝子の全てを包含する最も広い意味を有する。

【0022】本発明で用いる下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子としては、マウス下垂体

た。

【0017】

アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子と相同性を有する、ラット、ウサギ等の哺乳動物由来の遺伝子であれば任意のものを使用することができる。下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子は公知である(Yamamoto K, Hashimoto H, Hagihara N, Nishino A, Fujita T, Matsuda T, Baba A. Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. Gene. 1998, 211(1):63-9)。また、配列表の配列番号1及び2に記載したアミノ酸配列の情報に基づいて好適なプローブ又はプライマーを設計し、好適なcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、常法により単離することもできる。

【0023】(2)本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法は特に限定されないが、例えば、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物と、遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物とを交配することにより作製することができる。

【0024】(A)下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物

先ず、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製方法について説明する。

【0025】トランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製のために用いる導入遺伝子としては、上記した下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子を適当な哺乳動物用プロモーターの下流に連結した組換え遺伝子を使用することが好ましい。当該下垂体アデニレート

シクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の下流には、所望により、ポリAシグナルを連結することができる。

【0026】導入遺伝子の構築に用いる哺乳動物用プロモーター及びポリAシグナルの種類は特に制限されないが、例えば、ウイルス（例、サイトメガロウィルス、モロニー白血ウィルス、JCウィルス、乳癌ウィルスなど）由来遺伝子プロモーター、各種哺乳動物（例、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）および鳥類（例、ニワトリなど）由来のプロモーターなどが用いられる。

【0027】各哺乳動物および鳥類由来のプロモーターとしては、例えば、インスリン、アルブミン、エンドセリン、オステオカルシン、筋クレアチンキナーゼ、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパクキナーゼβサブユニット（The Journal of Biological Chemistry, Vol.271, No.3, p.1638-1644, 1996）、心房ナトリウム利尿性因子、ドーパミンβ-水酸化酵素、ニューロフィラメント軽鎖（The Journal of Biological Chemistry, Vol.270, No.43, p.25739-25745, 1995および同 Vol.272, No.40, pp25112-25120, 1997）、メタロチオネイン、メタロプロテナーゼ1組織インヒビター、平滑筋αアクチン、ポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク、血清アミロイドPコンポーネント、レニンなどのプロモーターが用いられる。これらの中でも、本発明においては、脾臓で高発現することが可能なインスリン（例えば、ヒトインスリン）プロモーターを使用することが特に好適である。

【0028】さらに、本発明で用いる組換え遺伝子には、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の発現に必要なターミネーターを連結してもよい。該ターミネーターは、トランスジェニック動物において、目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（いわゆるポリA）として使用され、ウィルス由来、各種哺乳動物または鳥類由来の各遺伝子の配列が用いられる。具体的には、シミアンウィルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。その他、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子をさらに高発現させる目的で、既知の遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域を連結することができる。さらには、真核生物遺伝子のイントロンの一部をプロモーター領域の5'上流に、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも可能である。

【0029】上記導入遺伝子に組み込まれた下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子が、受精卵等の細胞内で発現すると、細胞内に下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子が産生されるようになる。

【0030】下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、例えば、非ヒト哺乳動物の受精卵に下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子を導入し、当該受精卵を偽妊娠雌性非ヒト哺乳動物に移植し、当該非ヒト哺乳動物から下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子が導入された非ヒト哺乳動物を分娩させることにより作製することができる。

【0031】非ヒト哺乳動物としては、例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ラット、ウサギ等のげっ歯類の他、ニワトリ、イヌ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ブタ、サル等を使用することができるが、作製、育成及び使用の簡便さなどの観点から見て、マウス、ハムスター、モルモット、ラット、ウサギ等のげっ歯類が好ましく、そのなかでもマウスが最も好ましい。

【0032】本発明で用いるトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、胚芽細胞と、生殖細胞あるいは体細胞とが、非ヒト哺乳動物またはこの動物の先祖に胚発生の段階（好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）において外来性の下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子を含む組み換え遺伝子を導入することによって作出される。下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子を含む組み換え遺伝子の構築は上記した通りである。

【0033】受精卵細胞段階における下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように維持されるように行う。遺伝子導入後の作出動物の胚芽細胞において、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子が存在することは、作出動物の後代がすべてその胚芽細胞および体細胞のすべてに下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子が存在することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子を有する。

【0034】本発明のトランスジェニック動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、当該遺伝子保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することができる。導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該遺伝子を過剰に有するように繁殖継代することができる。下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の発現部位を同定するためには下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の発現を個体、臓器、組織、細胞の各レベルで観察することができる。また、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドの抗体を用いた酵素免疫検定法によりその発現の程度を測定することも可能である。

【0035】以下、トランスジェニック非ヒト哺乳動物がトランスジェニックマウスの場合を例に挙げて具体的に説明する。下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドをコードするcDNAをプロモーターの下流に含有する導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、偽妊娠雌性マウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりトランスジェニックマウスを作製することができる。上記マウスの受精卵としては、例えば、129/sv、C57BL/6、BALB/c、C3H、SJL/Wt等に由来するマウスの交配により得られるものなら任意のものを使用できる。

【0036】また、注入する導入遺伝子の数は受精卵1個当たり100~3000分子が適当である。そしてまた、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等よりDNAを抽出し、導入した下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

【0037】(B) 遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物 次に、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の作製に用いる、遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物について説明する。

【0038】インスリン作用の相対的あるいは絶対的な不足によって引き起こされる糖質代謝異常を中心とする種々の代謝異常である糖尿病は、大きくインスリン依存性糖尿病(I型:IDDM)とインスリン非依存性糖尿病(II型:NIDDM)との2つに分類される。インスリン依存性糖尿病は自己免疫的な機序により膵島β細胞の破壊が進行し、インスリン分泌低下をきたすことにより発症し、一方、インスリン非依存性糖尿病は遺伝的なインスリン分泌低下と骨格筋でのインスリン抵抗性の素因に、肥満によるインスリン抵抗性が加わり発症に至り、このインスリン非依存性糖尿病は全糖尿病の95%以上を占めている。

【0039】現在、遺伝子レベルで原因がわかっている糖尿病としては、インスリン異常症、インスリン受容体異常症、グルコキナーゼ遺伝子異常症(MODY2)、ミトコンドリアDNA異常による糖尿病などがあり、また、連鎖解析によりMODY1、MODY3、NIDDM1、NIDDM2の遺伝子の染色体上の位置がマッピングされている。一方、糖尿病モデル動物としては、KKマウスに肥満遺伝子Ay遺伝子を導入することにより作製された糖尿病モデルマウス(KKA_yマウス;日本クレアから入手可能)、NOD(non-obese diabetic)マウス、ヒトインスリン遺伝子プロモーターの下流に結

合した熱衝撃蛋白質70遺伝子を有する糖尿病発生遺伝子をマウスに導入した糖尿病発生トランスジェニックマウス、II型真性糖尿病のトランスジェニック動物モデル等が提案されている。

【0040】本発明では、上記したような遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物であれば任意のものを使用することができる。これらの中でも、特に好ましいものは、KKマウスに肥満遺伝子Ay遺伝子を導入することにより作製された糖尿病モデルマウス(KKA_yマウス;日本クレアから入手可能)である。また、遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物を本明細書で上記した方法に準ずる方法により新たに作製し、それを使用してもよい。

【0041】本発明では、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物と、遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物とを交配することによって、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現し、かつ遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製することができる。

【0042】本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを過剰発現すると同時に、糖尿病を発症することを特徴とするものであり、糖尿病の治療薬又は予防薬のスクリーニング試験に利用可能なモデルであり、また糖尿病の発生機構の解明などの研究分野においても有用である。

【0043】また、上記した本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物の一部としては、非ヒト哺乳動物の細胞、細胞内小器官、組織および臓器のほか、頭部、指、手、足、腹部、尾などが挙げられ、これらも全て本発明の範囲内に属する。

【0044】(3) 糖尿病の治療剤及び/又は予防剤のスクリーニング

本発明による糖尿病の治療及び/又は予防薬のスクリーニング方法は、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを過剰発現すると同時に、糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いて行うことができる。即ち、本発明の糖尿病発症性のトランスジェニック非ヒト哺乳動物(例えば、トランスジェニックマウスなど)に、被検物質を投与し、該トランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られた尿の尿糖値や、眼球の付け根又は尻尾などから採血した血液の血糖値を測定したり、当該動物の生存率を検討することにより、該被検物質の糖尿病治療効果や予防効果を評価することができる。あるいはまた、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に被検物質を投与し、投与後にお

ける下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドの発現状態や生体内における動態を分析することにより、該被験物質の糖尿病治療効果や予防効果を評価することもできる。

【0045】すなわち、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を利用することにより、糖尿病あるいはそれらの合併症の治療効果及び予防効果を評価することが可能であり、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、糖尿病の病態評価モデル動物として利用することができる。例えば、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いて、これらの病態回復および重篤程度を判定し、この疾患の治療方法の検討を行うことも可能である。

【0046】さらにまた、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いることによって、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドの過剰発現が、上記疾病などの改善効果を発揮することができるかどうかを検討することが可能であり、これら疾患のメカニズムを解明することができる。

【0047】本発明のスクリーニング方法に供される被験物質としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。またペプチドライブラリーや化合物ライブラリーなど、多数の分子を含むライブラリーを被験物質として使用することもできる。

【0048】本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に被験物質を投与する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられる。また、被験物質の投与量は、投与方法、被験物質の性質などにあわせて適宜選択することができる。本発明のスクリーニング方法において、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に被験物質を投与した場合、該トランスジェニック非ヒト哺乳動物における尿糖値や血糖値が減少したり、生存率が向上した場合には、該被験物質を糖尿病に対して予防効果又は治療効果を有する物質として選択することができる。

【0049】本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質は、上記した被験物質から選ばれた物質であり、糖尿病に対して予防・治療効果を有するので、糖尿病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた物質から誘導される化合物も同様に医薬として用いることができる。該スクリーニング方法で得られた物質は塩を形成していてもよく、該物質の塩としては、生理学的に許容される酸（例えば、無機酸、有機酸）または塩基（例えば、アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。

【0050】塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0051】該スクリーニング方法で得られた物質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。

【0052】例えば、該物質を生理学的に許容される担体、香味剤、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などと一緒に混和することによって製剤を製造することができる。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなビヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを、溶解または懸濁させるなど常法に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80TM、HCO-50）などを併用することもできる。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。

【0053】また、上記の糖尿病の治療剤及び／又は予防剤には、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などを配合してもよい。

【0054】このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物に対して投与することができる。該物質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、経口投与する場合、一般的に成人においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～

50mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常成人に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~100mg程度、好ましくは約0.1~50mg程度を静脈注射により投与する。

【0055】(4)下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド又はそれをコードする遺伝子を用いた薬剤

下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)の生理作用は存在部位により異なり多様である。これまでにPACAPの作用として、ラット下垂体初代培養細胞におけるcAMPの産生促進、ラット下垂体スーパーフュージョン法におけるGH、ACTH、PRL、LHの分泌促進、副腎髄質クロム親和性細胞腫由来細胞PC12hにおけるcAMPの産生と神経突起伸長促進、下垂体培養細胞におけるインターロイキン-6の産生促進、ラットアストロサイトの一次培養におけるcAMP産生促進と神経細胞死阻止作用の促進など様々なものが報告されている。

【0056】膵臓においてはPACAP免疫陽性神経が膵島に投射すること、PACAP受容体サブタイプのうちPACAPに親和性の高いPAC1受容体と、PACAPとVIPの両者に同程度の親和性を示すVPAC2受容体の発現が膵臓β細胞にみられること、単離膵島からのグルコース誘導性インスリン分泌を 10^{-14} Mという極めて低濃度で促進することが知られている。またPACAPは様々な細胞で、細胞保護作用あるいは、分化、増殖の促進作用を持つことから、膵臓β細胞においてもこのような作用が見られることが予測される。しかしながら、in vivoにおけるPACAPの膵島への作用は明らかになっていない点が多かった。

【0057】上記した状況下において、本発明者らは、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現し、かつ遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物を用いて、糖尿病病態において下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドが糖代謝にどのような作用を及ぼすかについて検討を行った所、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを体内で過剰発現させることにより、膵臓の臓器重量が大きくなり、膵島の過形成が抑制されていることを初めて見出した。

【0058】即ち、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを糖尿病患者の体内で過剰発現させることにより、膵臓の増殖を促進できることが今回新たに判明した。

【0059】従って、本発明によれば、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを有効成分として含む、膵臓組織の再生促進あるいは膵島の形成制御のため

の薬剤が提供される。ここで言う下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドとは、天然型の下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドのみならず、本明細書中上記した変異体の全てを包含する最も広い意味を有する。

【0060】本発明の薬剤で治療可能な哺乳類動物としては、たとえばウシ、ブタ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ、げっ歯類動物(例えば、実験動物など)、ならびにヒトなどが挙げられる。下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドとしては、PACAP38、PACAP27、それらの変異体、類似体(アナログ)、及びこれらの作動薬(アゴニスト)などを使用することができる。PACAP38、PACAP27、それらの変異体、類似体(アナログ)、及びこれらの作動薬(アゴニスト)は、当業者に公知の方法により製造することができる。

【0061】下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを化学合成により製造する場合は、ペプチドの合成の常法手段によって合成できる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、カルボイミダズール法、酸化還元法等が挙げられる。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれをも適用することができる。すなわち、ペプチド又はその塩を構成し得るアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とするペプチド又はその塩を合成することができる。縮合方法や保護基の脱離としては、公知のいずれの手法を用いてもよい[例えばBodanszky, M and M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)、Schroeder and Lueke, The Peptide, Academic Press, New York (1965)、泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(1975)等を参照]。

【0062】反応後は、通常の前製法、例えば溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせることにより、目的とするペプチド又はその塩を精製することができる。

【0063】下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドの別の製造方法としては、当該ペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を利用して、遺伝子工学的手法により微生物細胞、植物細胞、動物細胞などの宿主において組み換えタンパク質(ペプチド)として生産する方法が挙げられる。得られた粗合成ペプチドは、ゲル濾過、逆相HPLC、イオン交換カラム精製など通常のタンパク質又はペプチド精製に用いられる手段を用いて精製することが可能である。

【0064】下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドは、そのままで又は製剤で常用される各種の固体担体、液体担体、乳化分散剤等に含有させた形で、糖尿病患者や膵臓疾患(例えば、膵炎、膵臓癌の病巣摘出

後の膵臓再生促進など)の患者における膵島の形成を制御するための薬剤及び膵組織の再生を促進するための薬剤として使用することができる。下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを医薬組成物の形態で、糖尿病患者や膵臓疾患(例えば、膵炎、膵臓癌の病巣摘出後の膵臓再生促進など)の患者における膵島の形成を制御するための薬剤及び膵組織の再生を促進するための薬剤として使用する場合には、その製剤形態は、使用目的や使用対象に応じて適宜選択することができ、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤(液剤、懸濁剤等)等の形態で用いることができる。

【0065】また、錠剤形成に際して使用する担体としては、例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭化カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、水又はアルコール類を含ませたデンプン、ゼラチン、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)、メチルセルロース(MC)、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、寒天末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油糖の崩壊制御剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用することができる。さらに錠剤は必要に応じて通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖皮錠、ゼラチン被包錠、腸溶皮膜フィルムコーティング錠又は二重錠、多層錠とすることができる。

【0066】下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを注射剤として調製する場合には、液剤、乳剤及び懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であることが好ましく、これらの形態に成形するに際しては、希釈剤として水、エチルアルコール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を使用することができる。必要に応じて、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム等の安定剤、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、モノステアリン酸アルミニウム等の懸濁化剤、塩化ナトリウム、ブドウ糖、グリセリン等の等張化剤、パラオキシ安息香酸エステル類、ベンジルアルコール、クロロブタノール等の保存剤のほか、溶液補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を配合して使用することもできる。

【0067】上記各形態の医薬組成物の中には、さらに必要に応じて慣用されている着色剤、香料、風味剤、甘味剤等を配合することができ、また他の医薬品有効成分

を含有させてもよい。

【0068】下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドは、ヒトを含む哺乳動物に投与することができる。投与経路は経口投与でも非経口投与でもよい。本発明の薬剤の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、有効成分量として成人一日あたり10ng/kgから1,000mg/kg程度の範囲であり、好ましくは1μg/kgから10mg/kg程度の範囲である。上記投与量は一日一回投与しても一日に数回に分けて投与してもよい。また投与期間及び投与間隔も特に限定されず、毎日投与してもよいしあるいは数日間隔で投与してもよい。

【0069】また、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドは、医薬品としてのみならず、健康食品、飼料など人又は動物の体内に摂取される医薬品以外の製品に配合して使用することもできる。

【0070】さらに、本発明によれば、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドをコードする遺伝子を有効成分として含む、膵臓組織重量を増大させ、膵島の過形成を制御するための薬剤が提供される。上記した通り、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを体内に投与することにより、膵臓重量を増大させることができる。従って、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドをコードする遺伝子を糖尿病患者の体内に投与することにより下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを過剰発現させ、これにより膵臓組織重量を増大させ、膵島の過形成を制御することもできる。

【0071】具体的には、(1)膵臓疾患の患者に、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドをコードする遺伝子を導入して発現させるか、あるいは(2)膵臓由来の細胞に、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドをコードする遺伝子を導入して発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の膵臓の細胞における下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドを増加させ、PACAP作用を十分に発揮させることができる。すなわち、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドをコードする遺伝子は、膵臓の細胞を*in vitro*または*in vivo*で形質転換することができ、これにより遺伝子治療剤として用いることができる。

【0072】上記遺伝子治療剤は、常套手段に従って製造することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドをコードする遺伝子を生理学的に許容される担体、香味剤、賦

形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などと一緒に混和することによって製造することができる。

【0073】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。

【0074】注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。

【0075】投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは1.0～50mg、より好ましくは1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01mg～30mg程度、好ましくは0.1～20mg程度、より好ましくは0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

【0076】

【実施例】実施例1：PACAPトランスジェニックマウスの作製

(1) 導入遺伝子の作製 (図1)

ヒトインスリンプロモーター (1.9kb) の3' 下流側にウサギβグロビン遺伝子の3' 側 (1.7kb) をプラスミドpAT153上で繋ぎあわせた。次にこの融

合遺伝子を制限酵素EcoRIで消化し、ウサギβグロビン遺伝子の一部を全翻訳領域を含むマウスPACAP cDNAと置換した。ベクターの部分を取り除いた融合遺伝子を精製し、トランスジェニックマウスの作製に用いた。図1にPACAPトランスジェニックマウスの作製に用いた融合遺伝子の構造を示す。

【0077】(2) トランスジェニックマウスの作製 (図2)

BDF1マウス (BDF1雄×BDF1雌) の受精卵の前核に、上記(1)で作製した融合遺伝子をマイクロインジェクションした。生き残った受精卵を、あらかじめ精管結紮マウスと交配させて偽妊娠状態にしておいたレシピエントマウスの卵管に移植した。移植後19日目に帝王切開し、産まれてきたマウスを里親マウスに育てさせた。生後4週齢で尾から染色体DNAを単離し、制限酵素PstIで完全消化した後、マウスPACAP cDNAをプローブとしてGene Images™ (Amersham) を用いてSouthern blot解析を行うことにより、遺伝子型の判定を行った。図2に、トランスジェニックマウスの作製法を示す。

【0078】(3) 導入遺伝子の発現の臓器特異性 (図3)

Total RNAをトランスジェニックあるいはノントランスジェニックマウスの各臓器 (肺、脳、脾臓、心臓、肝臓) からacid guanidinium-phenol-chloroform法で抽出した。これらのRNAを1.5%アガロース/ホルムアルデヒド変性ゲルを用いて電気泳動を行った後、ニトロセルロースメンブランにトランスファーした。ランダムプライマー法で作製した³²P標識マウスPACAP cDNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの結果を図3に示す。図3の結果から、PACAPがトランスジェニックマウスの脾臓で発現していることが実証された。

【0079】(4) 免疫組織化学 (図4)

ネムブータル麻酔をさせたトランスジェニックあるいはノントランスジェニックマウスの心臓から、4%パラホルムアルデヒド/0.1%グルタルアルデヒド/0.1%リン酸緩衝液を灌流した。脾臓を摘出し、同固定液で4℃で1日、さらに4℃の30%ショ糖/0.1Mリン酸緩衝液に2日浸した。これらの固定した脾臓からcryostat (Leitz) を用いて厚さ15mmの凍結切片を作製した。一次抗体、二次抗体として、それぞれ抗PACAPウサギポリクロナール抗体、FITC-conjugated抗ウサギIgG抗体を用いた。サンプルを封入後、共焦点レーザー顕微鏡MRC-242 (Bio-Rad) で検鏡した。結果を図4に示す。図4の結果から、PACAPがトランスジェニックマウスの脾臓で発現していることが実証された。

【0080】実施例2：PACAPトランスジェニックマウスとKKAYマウスとの遺伝的交配による本発明の

トランスジェニックマウスの作製、並びにその解析

(1) 動物

全てのマウスは室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照明12時間(8:00-20:00)の飼育条件下で個別飼育し、餌と水は自由に摂取させた。

【0081】(2) KKAYマウスとの遺伝的交配(図5)

KKAYマウス(日本クレア)は1969年に、KKマウスに肥満遺伝子Ay遺伝子を導入することにより作製された糖尿病モデルマウスである。雌のKKAYマウスは不妊であるため、実施例1で作製したPACAPトランスジェニックマウスの雌とKKAYマウスの雄を交配させることにより交雑第1世代(F1)のマウスを得た。四種類の遺伝子型の+/+、Tg/+、Ay/+、Tg/+ : Ay/+ (C57BL/6とKKのハイブリットバックグラウンド)の判定は、尾から抽出したDNAを、導入したPACAP融合遺伝子特異的に増幅させるプライマー配列を用いたPCRにより行った。実験にはF1マウスのオスを用いた。各遺伝子型において予測されたメンデル比が観測された。図5に、(KKAY×PACAP Tg) F1マウスの作製の概要を示す。

【0082】(3) 免疫組織化学(図6)

pentobarbitalで麻酔した各F1マウスの脾臓を摘出し、4% paraformaldehyde/0.1 M PBSにて4℃で1日、さらに4℃の30%ショ糖/0.1 M PBSに1~2日浸透した。固定した脾臓からcryostat (Leica)を用いて厚さ15 μm の凍結切片を作製した。PACAP染色については、一次抗体として抗PACAPウサギポリクローナル抗体(株式会社矢内原研究所)を用い、二次抗体としてTexas red共役抗ウサギIgGを用いた。insulin、glucagonの同時染色には、一次抗体として抗insulinモルモットポリクローナル抗体(Dako)、抗glucagonウサギポリクローナル抗体(Dako)、二次抗体としてそれぞれ、抗FITC-共役抗モルモットIgG、Rhodamine共役抗ウサギIgGを用いた。サンプルを封入後、蛍光顕微鏡(Nikon TE300)で検鏡した。画像解析は形状解析ソフト、Mac SCOPE(MITANI CORPORATION)を用いて行った。結果を図6に示す。

【0083】図6において、+/+及びAy/+成体マウスの脾臓は、PACAP免疫反応性の脾島細胞を含まないが(A及びC)、Tg/+及びTg/+ : Ay/+マウスはPACAPで染色する脾島細胞を含む(B及びD)。個々の脾島の細胞内でのPACAPの発現は不均一である。図6の下側のグラフは脾臓内のPACAP含量をラジオイムノアッセイ法により測定したものである。Tg/+ : Ay/+マウスとTg/+マウスにおいて、脾臓PACAP含量の増加が確認される。

【0084】(4) 体重、血漿グルコース値、トリグリセリド値、インスリン値の測定(図7)

図7に示した各週齢のF1マウスについて、9:00~

12:00に採血を行った。採血は尾静脈から行った。得られた血漿のグルコース値、トリグリセリド値、インスリン値はそれぞれ、Glu CII test(Wako)、Triglyceride(INT)(SigmaDiagnostics)、Sensitive Rat Insulin RIA Kit(Linco)を用いて測定した。また、これらF1マウスについて、体重も測定した。結果を図7に示す。図7における値は平均±SEを示す。統計的有意差はScheffeのF検定によりANOVAで評価した。

【0085】(5) 摂食量の測定(図8)

食餌を設置した後、2週間自由に摂食させ、残量との差を摂食量とした。こぼれた餌は無視できるものとした。15週齢の+/+ (n=11)、Tg/+ (n=10)、Ay/+ (n=15)、及びTg/+ : Ay/+ (n=17)マウスの摂食量の測定結果を図8に示す。図8における値は平均±SEを示す。統計的有意差はScheffeのF検定によりANOVAで評価した。

【0086】(6) 耐糖能試験(図9)

同腹のF1マウスを14時間絶食させた後、2 mg/g body weightのグルコースを経口投与または、腹腔内投与した。経時的にマウスの尾静脈から全血を採取し、血漿グルコース値、血漿インスリン値を測定した。結果を図9に示す。図9における値は平均±SEを示す。統計的有意差はScheffeのF検定によりANOVAで評価した。

【0087】(7) インスリン負荷試験(図10)

週齢の対応した、同腹のマウスを2時間絶食(8:00-10:00)させた後、2 Unit/Kg body weightのインスリンを腹腔内投与した。経時的に尾静脈より採血を行い、血漿グルコース値を測定した。結果を図10に示す。図10における値は平均±SEを示す。

【0088】(8) 組織形態学的解析(図11)

CRYOSTAT (Leica)を用いて作製した厚さ15 μm の脾臓切片をHematoxylin-eosin染色し切片試料を作製した。作製した切片試料をCHILLED CCD CAMERA(HAMAMATSU C5985)を用いて直接、または顕微鏡下で撮影した後、切片面積と、確認し得るすべての脾島面積をMac SCOPEにて計測した。結果を図11に示す。解析は各遺伝子型につきn=9~11で行った。図11において、(A)は剖検時のマウス体重を示し、(B)は剖検時の脾臓湿重量を示し、(C)は脾島面積の平均を示し、(D)は脾臓面積1 mm²当たりの脾島の数を示し、(E)は全脾臓に対する脾島の相対体積を示し、(F)は総脾島重量を示す。総脾島重量は、切片の解析から脾島面積/脾臓面積を計算し、これを3/2乗して体積比とする。さらに、これに脾臓質重量をかけたものを総脾島重量 (Total islet volume) とした。統計的有意差はFisherのPLSD検定によりANOVAで評価した。

【0089】(9) まとめ

実施例2では、脾臓特異的PACAP過剰発現トランスジェニックマウス(Tg/+)と、優性遺伝形式で肥満・糖尿病を発症するKKAYマウス(Ay/+)との交

雑第一世代マウスを作製し、各表現型について解析を行った。免疫組織学的な解析により、Tg/+マウスと、Ayアレルを有するTg/+マウス (Tg/+ : Ay/+) の膵島において、PACAP免疫陽性細胞が観察された。

【0090】経口、腹腔内グルコース負荷試験のいずれにおいても、+/+、Tg/+マウスの耐糖能に大きな違いは認められなかった。また、Ay/+マウスとTg/+ : Ay/+マウスの間にも大きな違いは認められなかった。また、経口グルコース負荷試験において、AUC_{insulin}で示される血漿インスリン値の上昇はTg/+ : Ay/+マウスと、Ay/+マウスで同様であった。従って、Tg/+ : Ay/+マウスはAy/+マウスと同様のインスリン分泌反応性を示すことがわかった。

【0091】上記の結果から、Tg/+ : Ay/+マウスは、Ay/+マウスに比べ、血漿インスリン値は低い値を示すものの、インスリン感受性及びインスリン分泌能は同等であることが示された。さらに、図11に示されるように、ヘマトキシリン-エオシン染色によりこれらのF1マウスの膵島を形態学的に解析した結果、Tg

/+ : Ay/+マウスにおける膵島の量はAy/+マウスよりも小さくなる傾向が示された。

【0092】

【発明の効果】本発明により提供される、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド遺伝子の導入により該ポリペプチドを発現し、かつ遺伝子操作により糖尿病を発症することを特徴とするトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチドの発現により膵臓組織重量を増大し、膵島の過形成が制御された糖尿病発症モデル動物として、糖尿病の発症機構の解明、糖尿病の予防剤や治療剤のスクリーニングのために有用である。また、本発明によれば、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ポリペプチド又はそれをコードする遺伝子を有効成分として含む、糖尿病患者や膵臓疾患（例えば、膵炎、膵臓癌の病巣摘出後の膵臓再生促進など）の患者における膵島の形成を制御するための薬剤及び膵組織の再生を促進するための薬剤を新たに提供することが可能になった。

【0093】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Transgenic non-human mammal

<130> A21060A

<160> 2

【0094】

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> sheep

<400> 1

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys

20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys

35

【0095】

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> sheep

<400> 2

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu

20 25

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、PACAPトランスジェニックマウス

の作製に用いた融合遺伝子の構造を示す。

【図2】図2は、トランスジェニックマウスの作製法を

示す。

【図3】図3は、PACAP発現の臓器特異性をノザンブロット解析により調べた結果を示す。

【図4】図4は、トランスジェニックマウスとノントランスジェニックマウスの脾臓における抗PACAP抗体を用いた免疫染色の結果を示す。

【図5】図5は、(KKAY×PACAP Tg) F1マウスの作製の概要を示す。

【図6】図6は、F1マウス脾臓細胞の免疫組織化学分析の結果を示す。

【図7】図7は、F1マウスの体重、血漿グルコース値、血漿トリグリセリド値、及び血漿インスリン値の測

定結果を示す。

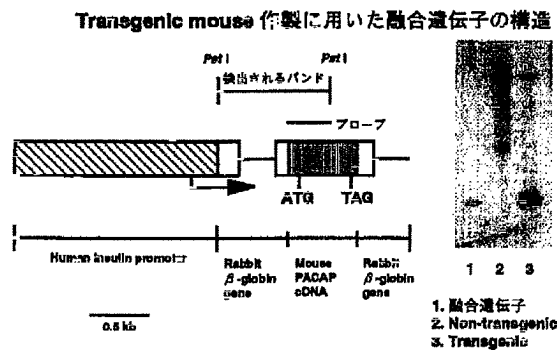
【図8】図8は、15週齢の+/+(n=11)、Tg/+(n=10)、Ay/+(n=15)、及びTg/+ : Ay/+(n=17)マウスの摂食量の測定結果を示す。

【図9】図9は、F1マウスにおける耐糖能試験の結果を示す。

【図10】図10は、F1マウスにおけるインスリン負荷試験の結果を示す。

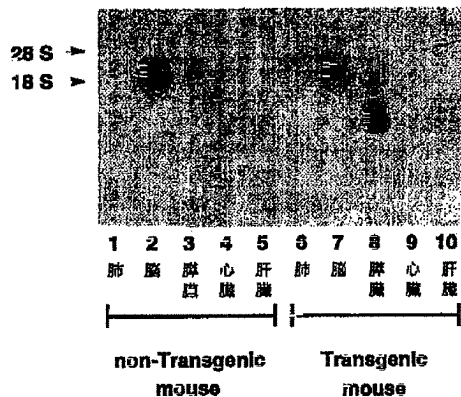
【図11】図11は、成体F1マウスにおける脾島の組織形態学的解析の結果を示す。

【図1】

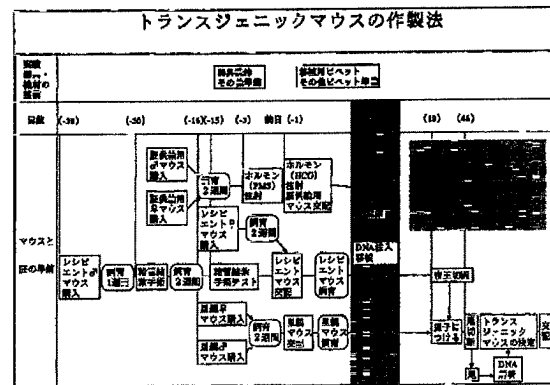


【図3】

Northern blot 解析による PACAP 発現の臓器特異性の検討

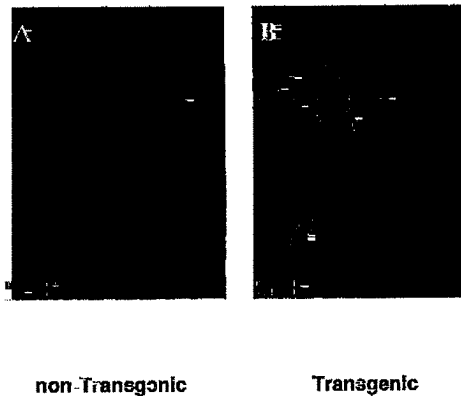


【図2】

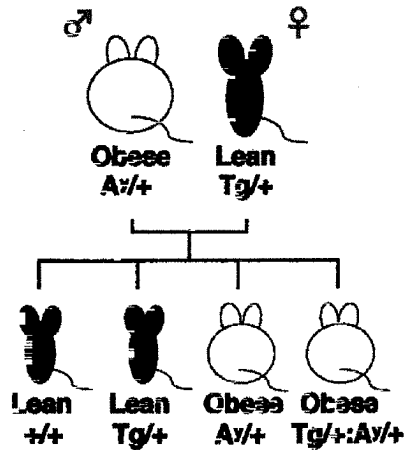


【図4】

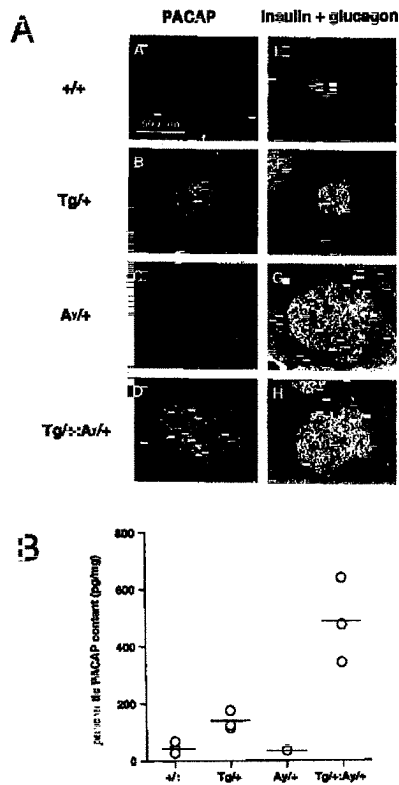
Transgenic mouse と non-Transgenic mouse の脾臓における抗 PACAP 抗体を用いた免疫染色



【図5】

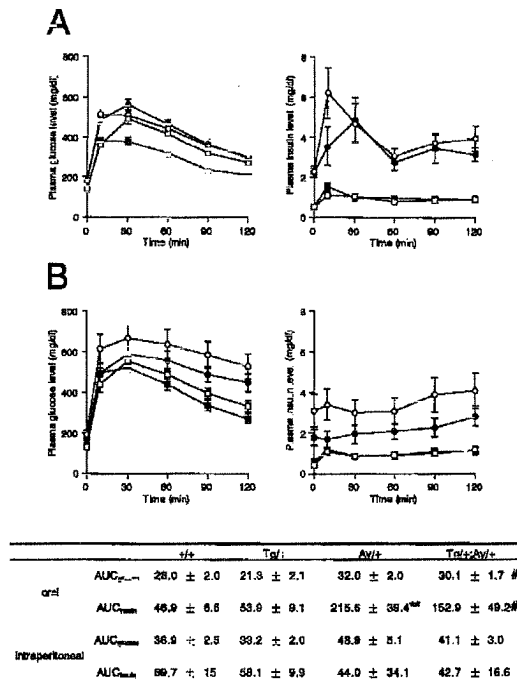
Generation of (KKA^y × PACAP Tg) F1 mice

【図6】



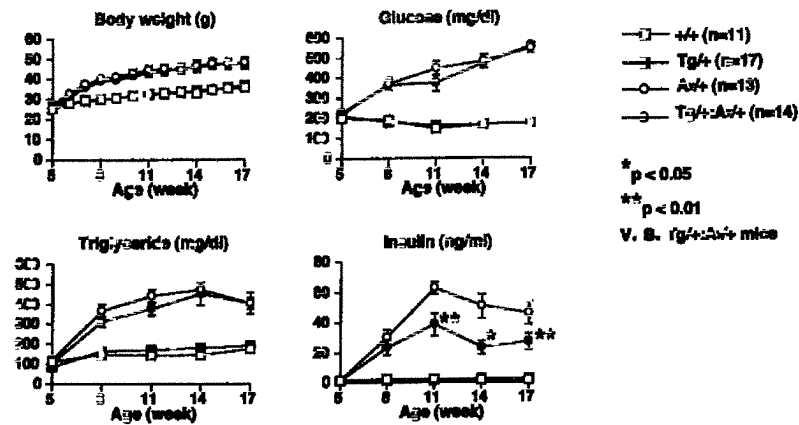
【図6】

【図9】

Table 1 Area under the glucose curve (g/dl in 120 min) and insulin curve (ng/ml in 120 min) in oral GTT and intraperitoneal GTT. ^{##}p < 0.01 vs. +/+ mice, [#]p < 0.05 vs. Tg/+ mice.

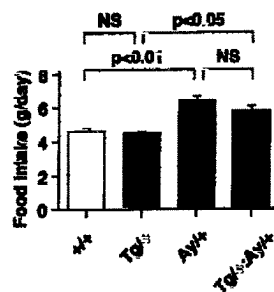
【 図 7 】

Plasma insulin levels were decreased in Tg⁺:Ay⁺ mice compared with Ay⁺ mice.

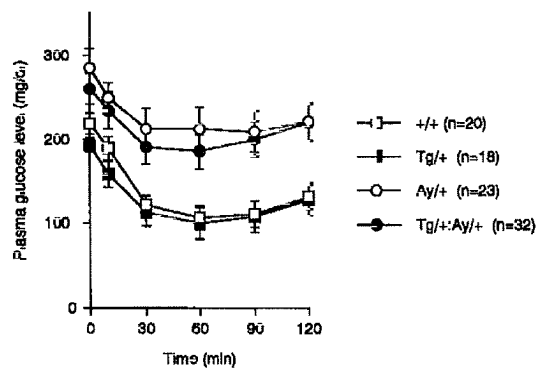


【 図 8 】

Ay⁺ mice and Tg⁺:Ay⁺ mice represent similar hyperphagia



【 図 10 】



【図11】

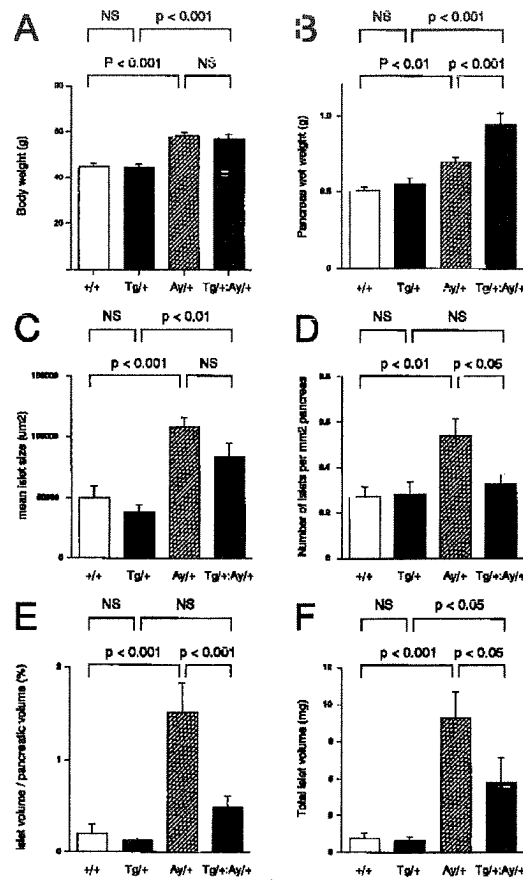


図11

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 P 3/10		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 15/09		33/50	Z
G 0 1 N 33/15		C 0 7 K 14/47	
33/50		C 1 2 N 15/00	A
// C 0 7 K 14/47		A 6 1 K 37/24	

(72)発明者 橋本 均
大阪府箕面市小野原東5-5 フォルク北
千里L棟303号室

(72)発明者 新谷 紀人
大阪府茨木市蔵垣内2-16-23 善幸コー
ポラス1-207

(72)発明者 富本 修平
大阪府茨木市春日3-2-17

(72)発明者 松田 敏夫
大阪府摂津市千里丘東1-13-11-605

Fターム(参考) 2G045 AA29 BB24 CB01 CB17 DA31
FA16 JA01
4B024 AA11 BA80 CA04 CA05 CA07
CA09 DA02 EA04 GA11 GA18
HA03 HA11
4C084 AA02 AA13 AA17 BA44 DB01
NA14 ZA661 ZC032 ZC351
4H045 AA10 AA30 BA19 CA40 EA50
FA74